

感 作 血 球 の 免 疫 学 的 意 義

第 3 報

腸内病原菌を以てする研究

第 1 篇 菌体蛋白及び多糖体の分離精製並びに
菌体加熱浸出液に就いて

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任：柿下正道教授）

岡 田 努

（受付：昭和29年10月7日）

**Tsutomu OKADA : IMMUNOLOGICAL STUDIES ON ERYTHROCYTES
SENSITIZED WITH BACTERIAL COMPONENTS**

Part 3. Experimental Studies on the Intestinal Bacilli (*Bac. typhi*, *Bac. paratyphi B* and *Bac. dysenteriae*)

No. 2. Isolation and Purification of Proteins, Polysaccharides and Heat-extracts from Bacilli, and Their Physico-Chemical Properties

*Department of Bacteriology and Immunology, Research Institute of
Tuberculosis, Kanazawa University.*

(Director : Prof. Masamichi KAKISHITA)

(Received for publication : Oct. 7, 1954)

緒 言

近来、免疫学の発展に伴い細菌菌体成分の解明は益々重要さを加えた。金沢大学結核研究所細菌免疫部に於ては先に藏¹⁾、秋山²⁾、杉林³⁾等によつて結核菌、腸チフス菌、パラチフスB菌の菌体成分に関して一聯の研究がなされ、一方、山下⁴⁾、中島⁵⁾により、結核血球凝集反応の抗原並びに抗体に関して詳細な研究が進められて居る。私も之等の研究の一環として腸チフ

ス菌、パラチフスB菌、駒込B_{III}赤痢菌、川瀬赤痢菌の菌体蛋白、多糖体並びに菌体加熱浸出液について感作血球凝集反応によつて免疫学的研究を行い些か知見を得た。本篇に於ては菌体蛋白及び多糖体の分離法並びに菌体加熱浸出液の調製と、それらの物理化学的性狀について述べる事とする。

実 験

A) 菌体成分分離法

本実験に使用した菌株は

腸チフス菌： 本学医学部細菌学教室保存の相川株・

パラチフスB菌： 金沢市民病院附属伝染病院保存

の櫻木株。

駒込B_{III}赤痢菌： 当教室保存の金沢株・

川瀬赤痢菌： 同上。

の4株で、各菌を3%普通寒天平板培地に培養し、菌

体を採集して Alcohol-Ether 等量混合液を以て脱脂した後、蛋白は杉林の報告した方法により、又多糖体は秋山の結核菌から分離精製した方法に倣つて行つた。その詳細に関しては第1—2表に示す通りである。

B) 各分層の吟味

(1) 収量に就いて

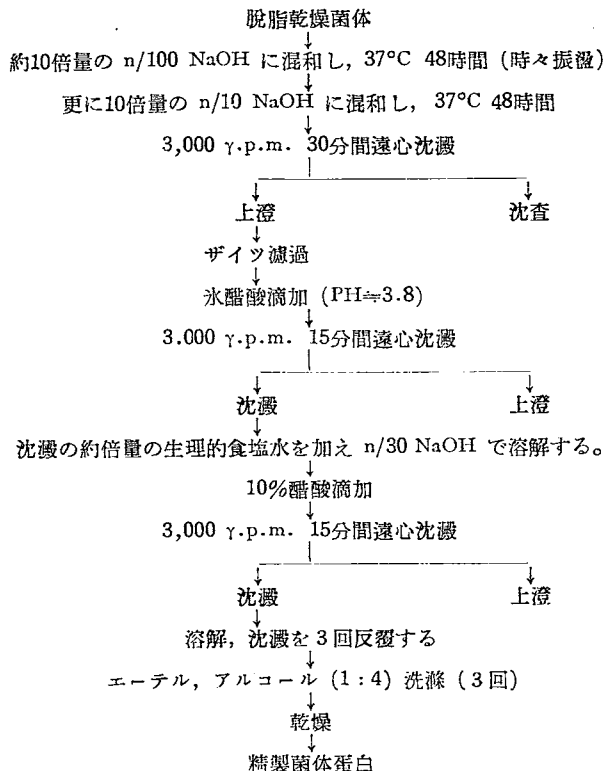
第3表に示す如く、腸チフス菌は湿潤菌体 92gm から 20.55gm (22.3%) の脱脂乾燥菌体を得、之より 3.24gm (脱脂乾燥菌量の 15.7%) の蛋白と 130mg (0.63%) の多糖体を、パラチフスB菌は湿潤菌体 81gm から 12.03gm (14.7%) の脱脂乾燥菌体を得、之より 2.05gm (脱脂乾燥菌量の 17%) の蛋白と 52mg (0.43%) の多糖体を、駒込 B_{III} 菌は湿潤菌体 145gm から 10.8gm (7.4%) の脱脂乾燥菌体を得、之より 650mg (脱脂乾燥菌量の 6.4%) の蛋白と 335mg (3.1%) の多糖体を、川瀬菌は湿潤菌体

112gm から 8.5gm (7.6%) の脱脂乾燥菌体を得、之より 1.35gm (脱脂乾燥菌量の 15.8%) の蛋白と 80mg (0.91%) の多糖体を夫々分離し得た。此の成績よりすれば赤痢菌は脱脂、乾燥する事によつて著しく減量する事が認められ、駒込 B_{III} 菌は極めて特徴的で、4株の菌の内蛋白収量は最も少く、多糖体は最も多く分離し得た。又他の3株の菌からの蛋白並びに多糖体の収量は概ね相似して居るが、概して赤痢菌は多糖体を多量に含有して居るものの如くである。

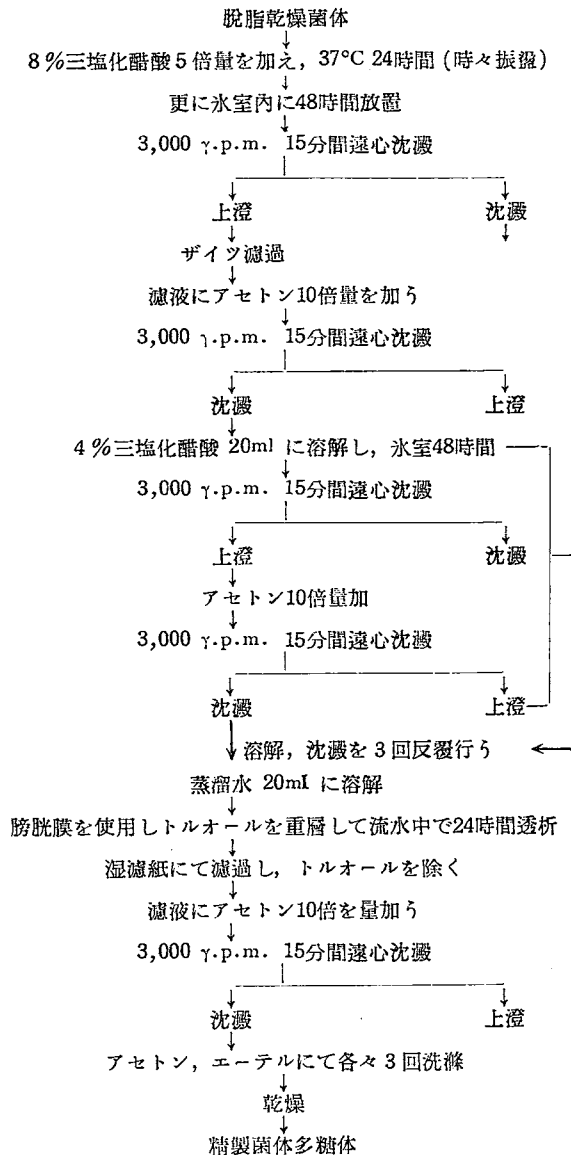
(2) 化学的性状に就いて

蛋白の性状は何れの菌から分離したものの微かに褐色を帯びた灰白色の粉末で、アセトン、アルコール、エーテル、酸に不溶、アルカリ性水に易く溶け、其の 0.1% 溶液を以てする各種蛋白反応は総て陽性で糖反応は総て陰性であつ

第1表 菌体蛋白分離法



第2表 菌体多糖体分離法



た。アツオトメトリーでの窒素含有量は腸チフス菌体蛋白 13.4%, パラチフス B 菌 13.2%, 駒込 B_{III} 菌 12.8%, 川瀬菌 13.5%であつた。(第4—5表参照)

多糖体は何れの菌から分離したのものも極めて微かに青色を帯びた白色の粉末で。アセトン, アルコール, エーテルに不溶, 水, 酸及びアル

カリ性水に易く溶け, 其の 0.5%溶液を以てする糖反応は総て陽性であり, 諸蛋白反応は総て陰性であつた。又 Hagedorn-Jensen 法による葡萄糖換算還元量は, 腸チフス菌多糖体は52%, パラチフスB菌53%, 駒込 B_{III} 菌56%, 川瀬菌 58%であつた。(第6—7表参照) 因に加水分解は2規定硫酸を以て30分間行つた。

第3表 菌体蛋白, 多糖体収量

菌 株	湿潤菌量	脱脂乾燥菌量	分 隔	収 量	%
腸チフス菌	92gm	20.55gm (22.3%)	蛋 白	3.24gm	15.7 %
			多 糖 体	130mg	0.63%
パラチフスB菌	81mg	12.03gm (14.7%)	蛋 白	2.05gm	17%
			多 糖 体	52mg	0.43%
駒込B _{III} 赤痢菌	145mg	10.80gm (7.4%)	蛋 白	650mg	6.4 %
			多 糖 体	335mg	3.1 %
川瀬赤痢菌	112mg	8.50gm (7.6%)	蛋 白	1.35gm	15.8 %
			多 糖 体	80mg	0.91%

第4表 菌体蛋白化学的性状

	反 応	
蛋 白 反 応	Heller's test	+
	Picric acid reaction	+
	Sulfosalicylic acid reaction	+
	Biuret reaction	+
	Ninhydrin reaction	+
	Xanthoproteic reaction	+
	Pot. tetrabromophthalein ethylester reaction	+
糖 反 応	Phloroglucinol reaction	—
	Trommer's test	—
	Molisch's test	—
	Selivanoff's test	—
	Tollens's test	—

註. 反应用蛋白液は 0.1%溶液

第5表 菌体蛋白窒素含有量

菌 株	N ₂ 含有量%
腸チフス菌体蛋白	13.4
パラチフスB菌体蛋白	13.2
駒込B _{III} 赤痢菌体蛋白	12.8
川瀬赤痢菌体蛋白	13.5

註. アツオトメーターにて測定

(3) 菌体加熱浸出液に就いて

各菌共, 菌体を 2mg/ml の割に生理的食塩水又は蒸留水に浮游せしめて水浴中で 100°C に30分間加熱した後, 其のまゝ氷室に一昼夜静置して, 之を 3,000 r.p.m. 30分間遠心沈澱し

第6表 菌体多糖体化学的性状

	反 応	
蛋 白 反 応	Heller's test	—
	Picric acid reaction	—
	Sulfosalicylic acid reaction	—
	Biuret reaction	—
	Ninhydrin reaction	—
	Xanthoproteic reaction	—
	Pot. tetrabromophthalein ethylester reaction	—
糖 反 応	Phloroglucinol reaction	+
	Trommer's test	+
	Molisch's test	+
	Selivanoff's test	+
	Tollens's test	+

註. 反应用溶液は 0.5%溶液

第7表 菌体多糖体還元糖量

菌体多糖体種類	還元糖量%
腸チフス菌体多糖体	52
パラチフスB菌体多糖体	53
駒込B _{III} 赤痢菌体多糖体	56
川瀬赤痢菌体多糖体	58

註. Hagedorn-Jensen 法による葡萄糖換算値,
加水分解: 2 規定硫酸を以て30分間

て上澄をとつて之を加熱浸出液とした。該菌体加熱浸出液は余りにも稀薄なため, 其の理化学的検査には 1/5 量に加熱濃縮したものを使用した。

其の化学的性状は, 第8表に示す如く, 糖反

応は陽性であるが、蛋白反応は総て陰性であった。

第8表 菌体加熱浸出液化学的性状

反 応		
糖 反 応	Mofisch's test	+
	Phloroglucinol reaction	+
	Tollens's test	+
蛋 白 反 応	Heller's test	—
	Sulfosalicylic acid reaction	—
	Xanthoproteic reaction	—
	Ninhydrin reaction	—
	Pot. tetrabromophthalein ethylester reaction	—

註. 腸チフス菌, パラチフスB菌, 駒込B_{III} 赤痢菌, 川瀬赤痢菌に共通性状

Hagedorn-Jensen 氏法による葡萄糖換算還元量は, Seitz 濾過前では加水分解しないものは5.1mg/dl, 加水分解後は26.1mg/dlであり, 濾過後は著明に減少して加水分解しないものは

第9表 腸チフス菌体加熱浸出液還元量

	加水分解前	加水分解後
濾 過 前	5.1mg/dl	26.1mg/dl
同 後	3.0mg/dl	8.1mg/dl

加水分解: 2規定硫酸を以て30分間
濾 過: Seitz 濾過器を使用

3mg/dl, 加水分解後は8.1mg/dlであった。(第9表参照)

因に此の値は腸チフス菌加熱浸出液について測定したものであるが, 他の3株の菌についても殆んど同様の値を得た。

電気泳動法により検討するに, 殆んど移動性のない単一な, 恐らく糖類に起因すると考えられる峯のみを認め, 蛋白の存在を示す峯は認められなかつた。第1図は腸チフス菌加熱浸出液について測定したものであるが, 他の3株の菌に於ても全く同様の様相を示した。

75%含水石炭酸を溶媒として東洋濾紙 No. 50 に展開し, 発色剤は糖に対してはアンモニア性硝酸銀を, アミノ酸に対しては Ninhydrin を用いてペーパークロマトグラフにより検討するにアミノ酸のスポットは全然証明出来ないで, 糖についてのみ第2図に示す如きスポットを認めたが, 此のスポットは $R_f=0.38$ の点にあつて, 蔗糖, グルコース, ラクトース等の存在を推定せしめるものである。

扱て, 菌体浸出加熱温度について検討するに, 70°C 以下に於ては化学的検査によつて糖を証明出来るのみで電気泳動法検査及びペーパークロマトグラフによつては先に記した如き特性は認められないで, 100°C 加熱後一昼夜放置した後に出現する事を確めた。

総括並びに結論

菌体成分の化学的分析研究としては1898年頃既に Ruppel⁹⁾ は結核菌から核酸, 核蛋白を分離し, Weyl¹⁰⁾ は結核菌をアルカリ処理後, 酸により沈澱せしめたものを核蛋白と考えて居る。細菌菌体蛋白の免疫学的研究に関しては, 既に1912年頃 Lustig, Galeotti¹¹⁾ 等により行れて居り, Heidelberg¹²⁾ 及び Avery¹³⁾ が肺炎双球菌の菌体蛋白及び多糖体について研究を行つてからは次第に活潑となり, 腸チフス菌, パラチフスB菌, 赤痢菌に関しても Zinsser & Parker¹⁴⁾, Goebel¹⁵⁾, Barantschik¹⁶⁾, 黒屋¹⁷⁾,

牛岡¹⁸⁾, 長瀬¹⁹⁾, 杉林²⁰⁾, 林²¹⁾等の広汎な研究がある。蛋白の精製に関しては, 菌体を脱脂後加熱浸出して等電点で沈澱せしめる黒屋法, 弱アルカリ液で菌体浸出後弱酸で沈降せしめる Wooldridge 法, 更には菌体に酵素を作用せしめる Jobling & Bull 法等があり, 又, 多糖体精製法としては菌体浸出後, アルコール, アセトン等を以て沈澱せしめる方法が一般に用いられて居る。私は蛋白については, 藏²²⁾の方法を参酌した杉林²³⁾の法に倣つて, 苛性ソーダ溶液を以て脱脂菌体を浸出して Seitz 濾過器を以て

菌体を濾別した後、醋酸と苛性ソーダを以て沈澱、溶解を繰返し行つて精製した。又、多糖体については、Boivin の抽出法を参酌した秋山²⁾の法に倣つて、稀薄な三塩化醋酸溶液を以て脱脂菌体を浸出して Seitz 濾過器を以て菌体を濾別した後、アセトン沈澱と三塩化醋酸溶解を繰返して精製した。さて Middlebrook & Dubos¹⁷⁾が結核血球凝集反応を報告して以来、ツベルクリン活性因子の研究は更に広汎となり、精製多糖体、蛋白の検討が一層活潑となつた。一方結核菌の加熱浸出液に関しては当教室に於て中島⁵⁾、善田¹⁸⁾の詳細な研究が行れ、菌体を單に加熱する事によつて菌体浮游液中に浸出される菌体成分に強い血球凝集感作能のある事が明かにされた。結核菌以外の菌に於ても同様の事が認められて既に江口¹⁹⁾、広田²⁰⁾、大西等²¹⁾は夫々コレラ菌、淋菌、腸チフス菌の加熱浸出液感作血球凝集反応を報告して居るが、何れも血球凝集反応にのみ重点を置き浸出液の性状については触れる所が少い。私は腸チフス菌、パラチフスB菌、駒込 B_{III} 赤痢菌、川瀬赤痢菌の浸出液を作つて其の性状を詳細に吟味して血球凝集反応に使用し、免疫学的意義について研究中であるが、此の菌体加熱浸出液は寔に注目すべき成績を示し、糖のみを証明し蛋白を証明する事は出来なかつた。勿論、私の成績のみを以て直に菌体加熱浸出液中に蛋白は全然存在しないとは云い得ないにしても、糖類は明かに証明され、而も此の有効なる浸出液は 70°C 以下の浸出温

度に於ては認める事が出来ないのみならず 100°C 加熱直後よりも、むしろ其のまゝ一昼夜放置する事によつて特性の出現する事を実証した。

以上の成績より結論すれば次の如くである。

1) 腸チフス菌、パラチフスB菌、駒込 B_{III} 赤痢菌、川瀬赤痢菌の各脱脂乾燥菌体を、稀薄な苛性ソーダ溶液を以て浸出した後、Seitz 濾過器を以て菌体を濾別した濾液に就いて、醋酸沈澱と苛性ソーダ溶液溶解を繰返して得られた菌体蛋白は、化学的検査に於て蛋白反応は總て陽性を示し糖反応は總て陰性で、アツオトメトリーでの窒素含有量は 12.8%乃至 13.5%であつて略純粹な蛋白と認められるものであつた。

2) 同じ4株の菌の脱脂乾燥菌体を、稀薄な三塩化醋酸溶液を以て浸出した後、Seitz 濾過器を以て菌体を濾別した濾液に就いて、アセトン沈澱と三塩化醋酸溶液溶解を繰返して得られた菌体多糖体は、化学的検査によつて糖反応は總て陽性を示し蛋白反応は總て陰性で、52%乃至58%の還元糖 Hagedorn-Jensen 氏法により定量せる葡萄糖換算値)を含有するものであつた。

3) 同じ4株の菌の生理的食塩水又は蒸溜水浮游液を 100°C に30分間加熱し、其のまゝ一昼夜氷室内に放置した後、菌体を遠心分離して得た上清液は、化学的検査、電気泳動法検査並びにペーパークロマトグラフによつて検査するも糖のみを証明し蛋白は証明し得なかつた。

文

- 1) 藏尚之：金大結研年報，8 (上)，113，1949。
8 (下)，52，1950。9 (上)，85，1950。
- 2) 秋山舜一：金大結研年報，10 (上)，125，1951。
- 3) 杉林篤之：金大結研年報，11 (下)，211，1953。
- 4) 山下文雄：金大結研年報，12 (上)，153，1954。
- 5) 中島滋：金大結研年報，10 (下)，313，1952。
- 6) Ruppel, W. G.: Z. f. Physiol. Chem., 26, 218, 1898。
- 7) Weyl, T.: Deut. Med. Wochen-

献

- schr., 17, 256, 1891。
- 8) Lustig & Galeotti: cf. Z. Immunitätsforsch., 18, 465, 1913。
- 9) Heiderlberger, M. and Avery, O. T.: J. Exp. Med., 38, 73, 1923。
- 10) Zinsser, H. and Parker, J. T.: J. Exp. Med., 38, 73, 1923。
- 11) Goebel, W. F., Binkley, F. and Perlman, E.: J. Exp. Med., 81, 315, 1945。
- 12) Barantshik, M.: Z. Immunitätsforsch., 18, 465, 1913。
- 13) 黒屋政彦：日新医学，40 (3)，

- 57, 1953. 14) 林江沢 : 医学と生物学, 27 (6), 243, 1953. 15) 牛円新太郎 : 十全医学誌, 39, 2141, 1934. 16) 長瀬亀吉 : 実験医学誌, 14 (4), 369, 1930. 17) Middlebrook, G. and Dubos, R. J. : J. Exp. Med., 88, 521, 1948. 18) 善田輝義 : 未発表. 19) 江口穆 : 長崎医学会誌, 28 (12), 1392, 1953. 20) 広田武郎 : 東京医学誌, 62 (1-2), 1954. 21) 大西敏夫 : 日細誌, 8, 513, 1953. 22) 武谷健二 : 日本医事新報, 1572, 31, 1954. 23) Menzel, A. E. O. and Heiderberger, M. : J. Biol. Chem., 124, 301, 1938.

Summary

A series of experiments were performed in an attempt to determine whether the sensitizing active principle in hem- and kaolin-agglutination tests was present in the protein or the polysaccharide fraction of the bacillary body.

Bac. typhi, *Bac. paratyphi* and *Bac. dysenteriae* (Komagome B_{III} and Kawase strain) were involved in these experiments.

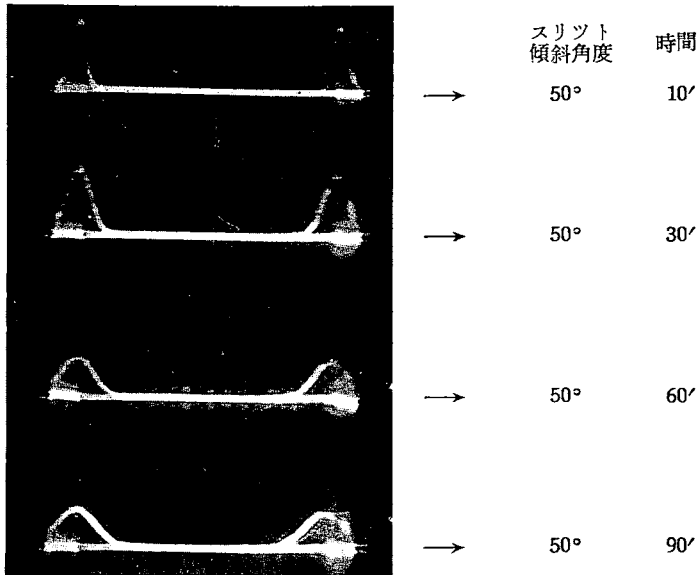
In this paper, the physico-chemical properties of these fractions and of the heat-extract were examined.

The results obtained were as follows :

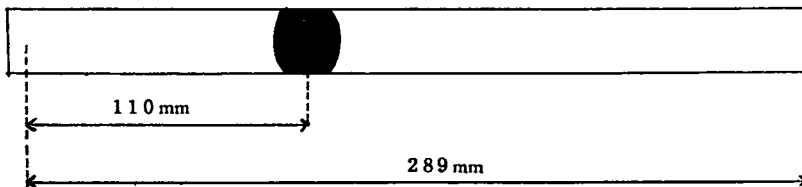
- 1) The protein fractions from the four kinds of bacilli were found to contain 12.8% to 13.5% of N, but a 0.1% solution of each of them showed no reaction of sugar.
- 2) The sugar fractions from the four kinds of bacilli were found to contain 52% to 58% of reducing sugar, calculated as glucose by weight, but a 0.5% solution of each of them showed no reaction of protein.
- 3) In the heat-extracts, reaction of polysaccharide only were observable, and testing by paper chromatography and electrophoresis did not show any protein reaction.

岡田論文附圖

第 1 図 腸チフス菌加熱浸出液電気泳動図



第 2 図 腸チフス菌加熱浸出液ペーパークロマトグラフ図



$R_f = 0.38$

溶 媒 : 75%含水石炭酸

展 開 : 東洋濾紙 No. 50

発色剤 : アンモニア性硝酸銀